10.22092/sppi.2020.122900

"مجله نهال و بذر"
جلد ۳۶، ش ماره ۱، سال ۱۳۹۹

مقاله کوتاه پژوهشی

Research Short Article

اثر نوع پیوند بر موفقیت ریزپیوندی درون شیشه ای برخی ارقام گیلاس

Effect of Grafting Method on In Vitor Micrografting Success of Some Sweet Cherry Cultivars

محمد اسماعیل نداف[۱]، ابراهیم گنجی مقدم[۲]، غلامرضا ربیعی[۳] و عبدالرحمن محمدخانی[۴]

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۲- دانشیار، بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران.
۳- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۴- دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۸/۱۰ **تاریخ پذیرش:۱۳۹۸/۱۱/۲۰**

نداف، م. ا.، گنجی مقدم، ا.، ربیعی، غ. و محمدخانی، ع. ۱۳۹۹. اثر نوع پیوند بر موفقیت ریزپیوندی درون شیشه ای برخی ارقام گیلاس . **مجله نهال و بذر۳۶: ۱۳۵-۱۲۹.**

گیلاس یکی از مهمترین محصولات باغی است و ایران از نظر تولید در جایگاه سوم دنیا قرار دارد (FAO, 2018). درحال حاضر استفاده از دانهال‌های بذری و همچنین قلمه در آن محدود بوده و تکثیر آنها بیشتر از طریق پیوند صورت می‌گیرد اما روش‌های تکثیر پیوند، باعث توسعه عوامل آلودگی خصوصا ویروسی می شود و موجب مشکلات کمی و کیفیت برای محصول می گردد (Ganji Moghdam and Buzari, 2007). از این رو، مدیریت صحیح در تولید مواد گیاهی عاری از ویروس ضروری است.

تلاش‌های بسیاری برای استفاده از مواد شیمیایی و کنترل ناقلین برای حذف عوامل ویروسی، هنوز نتایج موفقیت‌آمیزی نداشته است (Hussain *et al.,* 2014). ریزازدیادی می‌تواند منجر به تولید گیاهان کلونی سالم و یکنواخت در مدت زمان بسیار کمتری شود. با این حال در روش‌های کشت بافت نیز ثبات ژنتیکی در انبوه

نگارنده مسئول: menaddaf@gmail.com تلفن: ۰۵۱۳۳۸۲۲۳۰

گیاهان تولیدی در طول مدت ریزازدیادی تحت تاثیر عوامل زیادی قرار می‌گیرد ولی مشخصا مناسب‌ترین اندامی که باعث حفظ خصوصیات ژنتیکی رقم می‌گردد، مریستم جوانه‌هاست. استفاده از کشت مریستم یکی از موثرترین روش های حذف عوامل بیماری‌زای ویروسی هست که امروزه استفاده از مریستم انتهایی شاخساره متداول‌ترین شیوه برنامه‌های عاری سازی ویروسی در گیاهان، خصوصا درختان میوه می باشد (Navarro *et al.,* 1975)

باززایی کامل در بسیاری از گونه‌های چوبی از جمله گیلاس با کشت مریستم در شرایط کشت بافت مشکل می‌باشد (Monteuuis, 2012). از این رو ریزپیوندی برای این منظور روش کارآمدتری است چون در بسیاری از اوقات پس از کشت مریستم و به دست آمدن گیاهچه، تشکیل ریشه‌های نابجا مشکل جدی می باشد. در ریزپیوندی، مریستم جدا شده بر روی پایه بذری یا پایه رویشی جایگذاری شده و پس از رشد، واجد سیستم ریشه‌ای از پیش آماده خواهد بود (Navarro, 1988). انجام موفق روش ریزپیوندی توسط کشت مریستم اولین بار در درختان میوه روی مرکبات گزارش شده است (Navarro *et al.,* 1975). بعد از آن در بسیاری از درختان میوه از جمله گیلاس انجام شده است (Amiri, 2006).

این مطالعه با هدف بررسی تاثیر نوع پیوند و پوشش محل پیوند بر موفقیت ریزپیوندی هفت رقم گیلاس بر روی پایه رویشی گیزلا ۶ در شرایط درون شیشه ای انجام شد.

در این پژوهش از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با دو عامل در پنج تکرار و ده گیاهچه درهرتکرار به عنوان واحد آزمایشی استفاده شد. عامل اول شامل هفت رقم گیلاس: زرد ، سیاه مشهد، دوم رس، بینگ، پیش رس، تکدانه، حاج یوسفی و عامل دوم، نوع پیوند شامل: پیوند قاشی بدون پوشش محل پیوند، پیوند اسکنه بدون پوشش محل پیوند، پیوند قاشی با پوشش محل پیوند، پیوند اسکنه با پوشش محل پیوند بود.

پایه از کلون رویشی "گیزلا ۶" کشت بافتی بود (Daneshvar *et al.,* 2010). این پایه‌ها را جهت ریزپیوندی، زمانی که به قطر مناسب (بیش از پنج میلی‌متر) رسیدند، از محیط رشد خود جدا نموده و به عنوان پایه استفاده شدند. برای تهیهٔ پیوندک، ریزنمونه‌هایی از نوک شاخساره‌های هفت رقم گیلاس از ایستگاه تحقیقات باغبانی گلمکان مشهد به طول ۱/۵ تا دو سانتی‌متر از نهال‌های رشد یافته جدا شد و سپس با اتانول ۷۵ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و سپس در کلراکس ۲۰ درصد به مدت ده دقیقه گندزدایی شدند. پس از آبشویی با آب مقطر در شرایط استریل، ریزنمونه‌های مریستمی به اندازه دو میلی‌متر آماده سازی شد و در لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BAP برای استقرار مریستم کشت شدند. پس از حدود سه هفته جوانه‌های

مریستمی همراه با آغازه‌های برگی، برای ریزپیوندی به اندازه دو تا پنج میلی متر جدا شد و به عنوان ریز پیوندک استفاده گردیدند.

ریزپیوندی برابر با روش استاندارد برای گیلاس انجام شد (Amiri, 2006). تمام شرایط ریزپیوندی بجز نوع رقم، نوع پیوند و پوشش محل پیوند، ثابت در نظر گرفته شد. ریزنمونه‌های تولیدی از کشت مریستم به عنوان ریزپیوندک و ساقه‌های تولیدی از کلون گیزلا ۶ بعنوان پایه از محیط رشدی بیرون آورده شدند و ریزپیوندی زیر استریومیکروسکوپ انجام شد. به این صورت که برای پیوند اسکنه در قسمت انتهایی پایه ولی برای پیوند قاشی در جانب پایه برش عرضی به ابعاد یکی میلی‌متر ایجاد و مریستم جوانه در برش پایه قرار گرفت و سپس محل پیوند بدون هیچ پوششی یا با پوشش چسب پارچه ای استریل بسته شد.

ریزنمونه‌های پیوندی ابتدا درون لوله‌های کشت با محیط MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BAP کشت شدند (تمامی محیط های کشت دارای ۳۰ گرم در لیتر سوکروز و ۲/۸ گرم در لیتر فایتوژل بود که در pH= ۵/۷ ثابت شده بودند). گیاهان پیوند شده ابتدا به مدت یک هفته در شرایط نور کم (۱۰۰ لوکس) و سپس به مدت سه هفته تا زمان گیرایی موفق پیوند در شرایط دمای ۱ ± ۲۷ درجه سانتی‌گراد و نور ۱۵۰۰ لوکس و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی در اتاقک رشد با شرایط یکسان نگهداری شدند. بعد از سه هفته، گیاهان ریزپیوندی جهت ریشه زایی به محیط کشت MS همراه با یک میلی‌گرم در لیتر IBA منتقل شدند. گیاهان ریزپیوندی طی هشت هفته در شرایط درون شیشه‌ای نگهداری شدند و بعد از ریشه‌زایی جهت سازگاری در گلدان های حاوی پرلیت/ پیت موس (به نسبت یک: یک) داخل ظروف پلی اتیلنی قرار گرفتند.

شاخص‌های تعیین کننده در موفقیت پیوند در هرکدام از گیاهچه‌های ریزپیوند شده اندازه گیری شد. شاخص‌های درصد موفقیت پیوند (نسبت تعداد پیوندک‌های رشد کرده به تعداد کل پیوندها بعد از چهار هفته)، تعداد برگ‌های تولید شده روی پیوندک (سه هفته پس از گیرایی پیوند) و میزان رشد پیوندک (اندازه گیری طول قسمت رشد کرده پیوندک سه هفته پس از گیرایی) ثبت گردید. درپایان داده‌های بدست آمده توسط نرم افزار آماری SAS 9.0 تجزیه واریانس شده مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک و پنج درصد مقایسه و نمودارها توسط نرم افزار Excel 2010 ترسیم شدند.

تجزیه واریانس داده ها نشان داد که اثر اصلی نوع پیوند بر کلیه در شاخص‌های ریزپیوندی، در سطح احتمال یک درصد معنی‌داری بود (جدول تجزیه واریانس ارائه نشده است). اثر متقابل رقم × نوع پیوند بر کلیه شاخص ها بجز درصد موفقیت ریزپیوندی در سطح احتمال پنج درصد معنی دار بود.

تیمار پیوند اسکنه با پوشش محل پیوند

بیشترین میزان موفقیت پیوند (۴۲/۹ درصد)، تعداد برگ (۴/۲ برگ) و رشد طولی پیوندک (۶/۵ سانتی متر) را دارا بو (جدول ۱). بهترین نتیجه برای درصد موفقیت پیوند در پیوندک‌های رقم حاج یوسفی(۴۶/۶ درصد)، تعداد برگ در رقم زرد (۵/۲ برگ) و رشد طولی پیوندک در رقم بینگ (۷ سانتی متر) پیوند اسکنه با پوشش محل پیوند بدست آمد. بطورکلی، میانگین درصد موفقیت ریزپیوندی ۳۵ درصد، میانگین تعداد برگ ریزپیوندک‌های گیاهان ریزپیوندشده ۳/۱ برگ و میانگین رشد طولی ریزپیوندک ۴/۸ سانتی متر بود (جدول ۱).

جدول ۱- اثر نوع پیوند و پوشش محل پیوند روی شاخص‌های ریزپیوندی در گیلاس

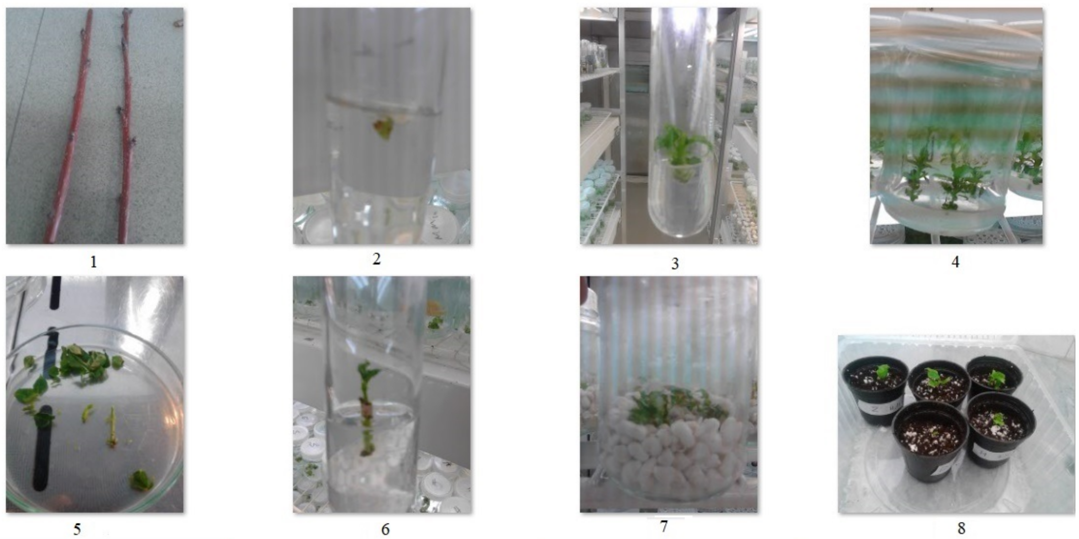
Table 1. Effect of grafting and cover type on micrografting indices in sweet cherry

			Grafting type		نوع پیوند	
Index	شاخص	ارقام Cultivar	پیوند قاشی بی پوشش Wedge grafting without cover	پیوند اسکنه بی پوشش Cleft grafting without cover	پیوند قاشی پوشش دار Wedge grafting with cover	پیوند اسکنه پوشش دار Cleft grafting with cover
Micrografting success (%)	درصد موفقیت ریز پیوندی	Bing	26.5ef	30.7def	33.3de	44.4ab
		Dovomres	27.3ef	40.2cd	30.9def	41.5bc
		Hajyousefi	29.3def	34.5de	37.1cd	46.6a
		Pishras	31.6de	37.5cd	32.5de	40.6bc
		Siah	23.9f	32.7de	36.4cd	44.3ab
		Takdaneh	27.3ef	34.5de	32.1de	41.8bc
		Zard	26.6ef	35.4de	37.9cd	41.2bc
		Mean	27.5	35.1	34.3	42.9
Number of leaf	تعداد برگ	Bing	2.1de	2.4cd	3.7bc	3.7bc
		Dovomres	2.0de	3.5bc	3.2bcd	4.2ab
		Hajyousefi	2.0de	3.3bc	2.7cd	4.1ab
		Pishras	2.3de	2.6cd	3.5bc	3.8bc
		Siah	2.2de	3.2bcd	2.9cd	4.0ab
		Takdaneh	1.9e	3.3bc	2.5cd	4.4ab
		Zard	2.3de	2.6cd	3.1bcd	5.2a
		Mean	2.1	2.9	3.2	4.2
Shoot length (cm)	طول پیوندک (سانتیمتر)	Bing	2.7e	4.2cd	4.2cd	7.0a
		Dovomres	3.7de	5.5bc	5.7bc	6.7ab
		Hajyousefi	3.4de	4.1cde	5.7bc	6.5ab
		Pishras	3.8de	4.4cd	4.6cd	6.8ab
		Siah	3.6de	4.0cde	4.3cd	6.2ab
		Takdaneh	3.5de	5.2bcd	4.9cd	5.7bc
		Zard	3.3de	4.9cd	5.2bcd	6.4ab
		Mean	3.4	4.6	4.9	6.5

میانگین هایی، در هر ردیف و برای هر صفت، که دارای حداقل یک حرف مشترک می باشند بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی دار ندارند.

Mean, in each column and for each factor, followed by at least one letter in common are not significantly different at the 5% probability level-using Duncan's Multiple Range Test.

بعد از سومین واکشت و بررسی شاخص‌های ریزپیوندی، گیاهچه‌های ریزپیوندی موفق، پس از رشد در محیط ریشه‌زایی قرار گرفتند و سه هفته بعد به محیط گلدان حاوی پرلیت و پیت موس (به نسبت ۱:۱) جهت سازگاری منتقل شدند (شکل ۱).



شکل ۱- مراحل ریزپیوندی گیلاس در شرایط درون شیشه ای، ۱: آماده سازی ریزنمونه مریستم، ۲: جداسازی و کشت مریستم، ۳: استقرار ریزنمونه‌های مریستمی، ۴: تکثیر نوشاخه‌های تولیدی، ۵: آماده سازی ریزپیوندک و پایه، ۶: انجام ریزپیوندی، ۷: ریشه‌زایی، ۸: سازگاری گیاهان ریزپیوندی.

Fig. 1. *In Vitro* Micrografting stages in sweet cherry: 1: preparation of explants, 2: separation and culture of meristem, 3: establishment of explants, 4: proliferation, 5: scion preparation and rootstock preparation, 6: micrografting, 7. rooting, 8. micrografting plant acclimation.

بطورکلی موفقیت ریزپیوندی در شرایط درون شیشه‌ای نسبت به شرایط پیوند در باغ خصوصا در هسته‌دارها پایین است که بدلیل عملیات سخت پیوند، ارتباط ضعیف پیوندک با پایه، فعالیت بالای اکسیدازها در شرایط درون شیشه‌ای است (Hussain *et al.,* 2014). این مطالعه اولین گزارشی است که جهت ریزپیوندی گیلاس که در آن از پایه رویشی کشت بافتی استفاده شد. این مطالعه مشخص کرد که موفقیت ریزپیوندی در شرایط درون شیشه ای تحت تاثیر نوع رقم نیست اما به نوع پیوند و وجود پوشش محل پیوند بستگی داشت. عدم وجود تفاوت معنی دار در میان ارقام مختلف گیلاس برای شاخص‌های ریزپیوندی احتمالا ناشی از میزان شباهت ژنتیکی زیاد بین ارقام مورد آزمایش و همچنین

سازگاری نسبی مشابه بین ارقام گیلاس و پایه گیزلا ۶ بود.

پیوند اسکنه در موفقیت ریزپیوندی تاثیر بالایی داشت که این به دلیل امکان ارتباط بیشتر بافت‌های لایه زاینده پایه و پیوندک در مقایسه با پیوند قاشی بود. همچنین ناهماهنگی و جابجایی پیوند در پیوند قاشی نسبت به اسکنه بیشتر دیده می شود که منجر به شکستگی ارتباط پیوندی و قهوه ای شدن اجزای پیوند می گردد (Montenuis, 2012). در ریزپیوندی گیلاس و هلو روی پایه های بذری با استفاده از پیوند اسکنه با موفقیت انجام شد (Deogratias *et al.,* 1986). در مطالعه پیوند نوک شاخه گیلاس رقم سیاه مشهد با استفاده از پیوند اسکنه بالاترین درصد موفقیت بدست آمد (Amiri, 2006).

نتایج این مطالعه نشان داد که موفقیت ریزپیوندی در پیوندهای که با پوشش پارچه چسبان محل پیوند بسته شد بسیار بیشتر بود. وجود پوشش پیوند بدلیل نگهداری پایدار بافت پیوند و همچنین حفظ رطوبت پایه و پیوندک در تشکیل پل پینه‌ای و موفقیت پیوند موثر است. متغیرهایی از جمله اتصال مناسب پایه و پیوندک و حفاظت ناحیه پیوند در طی جوش خوردن اثر چشمگیری در موفقیت ریزپیوندی دارد (Huang and Millikan,1980). با وجود پوشش پیوند، در اکثر ریزپیوندهای مورد مطالعه جابجایی وجود نداشت و میزان هم‌جوشی و موفقیت پیوند بالاتر بود که نتایج مشابه در ریزپیوندی زردآلو برروی پایه هلو بذری (Martinez *et al.,* 1979) مشاهده شد.

سپاسگزاری

این مقاله از داده های بخشی از پروژه ملی تولید گیاهان سالم و عاری از ویروس در هسته دارها که در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی طی سال های **۱۳۹۴** تا **۱۳۹۶** اجرا شد تهیه و نگارش شده است. نگارندگان از مدیریت و کارکنان بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی خصوصا آزمایشگاه کشت بافت باغبانی آن مرکز سپاسگزاری می کنند.

واژه های کلیدی: گیلاس، خوگیری،آغازین برگی، نوک ساقه، کشت بافت.

References

Amiri, M. 2006. In vitro technique to study the shoot tip grafting of sweet cherry (*Prunus avium* L.) var. Seeyahe Mashad. Journal of Food, Agriculture & Environment 41: 151-154.

Daneshvar Hossini, A., Ganji Moghadam, E., and Anahid, S. 2010. Effects of media

cultures and plant growth regulators in micropropagation of 'Gisela 6' rootstock. Annals of Biology Research 1 (2): 135-141.

Deogratias, J., Lutz, A., and Dosba, F. 1986. In vitro micrografting of shoot tips from juvenile and adult *Prunus avium* L. and *Prunus persica* L. Batsch to produce virus-free plants. Acta Horticulturae 193: 139–45.

FAO. 2018. Http: //faostat.fao.org/faostat.

Ganji Moghddam, E., and Bouzari, N. 2007. Practical and applied guide of sweet cherry; planting, husbandry and harvest. Agricultural Research, Education and Extensions Press. Mashhad, Iran. 344 pp. (in Persian).

Huang, S., and Millikan, D. F. 1980. *In vitro* micrografting of apple shoot tips. Horticulture Science 15: 741-743.

Hussain, G., Wani, M., Mir, M., Rather, Z., and Bhat, K. 2014. Micrografting for fruit crop improvement. African Journal of Biotechnology 13 (25): 2474-2483.

Martinez, J., Hugard, J., and Jonard, R. 1979. Different graft combinations with apices of peach, apricot and myrobolan realized in vitro. Academy of Sciences 288: 759-762.

Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiology of Plant 15: 437-497.

Navarro, L. 1988. Application of shoot-tip grafting in vitro to woody species. Acta Horticulturae 227: 43–55.

Navarro, L., Roistacher, C., and Murashige, T. 1975. Improvement of shoot-tip grafting in vitro for virus free citrus. Journal of the American Society for Horticultural Sciences 100: 471–479.